取 扱 説 明 書　シカジーニアス® 病原遺伝子検出PCRキット（下痢原性大腸菌用）
Cica Geneus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic *E.Coli*)

1. はじめに

下痢原性大腸菌（Diarrheagenic *Escherichia coli* ）とは、特殊な病原因子によってヒトに下痢症を引き起こす大腸菌の総称であり、その発病機序や症状によって 7 種類（EHEC、EPEC、ETEC、EIEC、EAEC、DAEC、EAST1EC）に分類されます。下痢原性大腸菌を保菌している家畜の生肉、あるいはその家畜の糞便に汚染された作物や井戸水などを経口摂取することで食中毒が発生する事例が数多く報告されています。本キットでは食肉などから増菌培養して得られた検体を用いて PCR を行い、増幅された産物を電気泳動により確認することで、簡便に下痢原性大腸菌のうち主要な 5 種類（EHEC、EPEC、ETEC、EIEC、EAEC）の病原性に関わる遺伝子の保有状況を確認することができます。

2. 製品形態

製 品 名	シカジーニアス® 病原遺伝子検出 PCR キット（下痢原性大腸菌用） Cica Geneus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic *E. coli*)
製品番号	08087-96
容　　量	100 回分
保管温度	冷凍保存 （-20 ℃以下）

3. 構成試薬 (100 回)

	個別名称	容量
試薬 A （ラベル白）	AptaTaq DNA Master (5×Conc.)※1	1,200 µl×1
試薬 B （ラベル赤）	PCR サプリメント	1,100 µl×2
試薬 C （ラベル紫）	プライマーミックス 1	400 µl×1
試薬 D （ラベル緑）	プライマーミックス 2	400 µl×1
試薬 E （ラベル黄）	プライマーミックス 3	400 µl×1
試薬 F （ラベル青）	ポジティブコントロール	400 µl×1
試薬 G （ラベル白）	6×ローディングバッファー	1,200 µl×1

※1AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K.の商品です。

4. 本キット以外に必要な試薬（別売）

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニアス® DNA 抽出試薬	120 回	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
01089-23	アガロース KANTO HC	100 g	電気泳動用
46510-79	10×TBE 緩衝液	1 L	電気泳動用
14575-43	臭化エチジウム溶液(2mg/ml)	10 ml	電気泳動用
49881-00	100 bp DNA Ladder	100 回	電気泳動用
711129-5	トリプトンソーヤブイヨン	500 g	増菌培養用
711131-5	トリプトンソーヤ寒天培地	500 g	選択分離用

機器類は、ヒートブロック、1.5 ml チューブ対応型遠心機、遺伝子増幅装置（サーマルサイクラー）、電気泳動装置、UVトランスイルミネーター、ゲル撮影装置などが必要です。また、この他 0.2 ml PCR チューブ、1.5 ml マイクロチューブ、20 µl および 200 µl マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、アガロースゲル染色用トレイなどが必要です。

5. 原理

下痢原性大腸菌の病原遺伝子領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、マルチプレックス PCR で遺伝子増幅を行い、アガロースゲル電気泳動に供して増幅産物のサイズを確認します。

6. 適用範囲

下痢原性大腸菌のうち腸管出血性大腸菌(EHEC)または志賀毒素産生性大腸菌（STEC）、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌（EIEC）、腸管凝集性大腸菌（EAEC）が保有する病原遺伝子の検出

7. プロトコール

①DNA 抽出

検体中に含まれる大腸菌を増殖可能な液体培地もしくは寒天培地で一晩培養し、フェノール/クロロホルムやシカジーニアス® DNA プレップキット（スピンカラム）などを利用して大腸菌の DNA 抽出・精製を行って下さい。

簡便なテンプレート DNA 調製方法として、別売のシカジーニアス® DNA 抽出試薬(製品番号：08178-96)を用いて粗抽出した DNA を検体に使用することもできます。この場合は、下記の手順で行って下さい。

・シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用方法

1） 別途調製したシカジーニアス® DNA 抽出試薬混合液 100 µl をマイクロチューブに入れて下さい。
2） 菌液 10 µl を上記マイクロチューブに入れて軽く混合して下さい。液体培養の場合は、培養液の原液を使用して下さい。平板培養の場合は、コロニーを滅菌水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1～3 番程度となるように懸濁したものを菌液として下さい。菌濃度は濃すぎないようにご注意下さい。
3） 72℃で 6 分間、94℃で 3 分間インキュベートして下さい。
4） 遠心分離(15,000rpm, 1 分間)し、その上清をテンプレート DNA として下さい。

②PCR

本キットは 3 種類のプライマーミックス（試薬 C、試薬 D、試薬 E）を使用します。下記条件で 1 検体あたり 3 種類の反応溶液を調製し、PCR を行って下さい。ポジティブコントロール(試薬 F)を使用する場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。

PCR 反応液組成：

Reaction mixture 1

テンプレート DNA（DNA 抽出液）	5.0 µl
試薬 A（AptaTaq DNA Master）	4.0 µl
試薬 B（PCR サプリメント）	7.0 µl
試薬 C（プライマーミックス 1）	4.0 µl
合計	20.0 µl

Reaction mixture 2

テンプレート DNA（DNA 抽出液）	5.0 µl
試薬 A（AptaTaq DNA Master）	4.0 µl
試薬 B（PCR サプリメント）	7.0 µl
試薬 D（プライマーミックス 2）	4.0 µl
合計	20.0 µl

Reaction mixture 3

テンプレート DNA（DNA 抽出液）	5.0 µl
試薬 A（AptaTaq DNA Master）	4.0 µl
試薬 B（PCR サプリメント）	7.0 µl
試薬 E（プライマーミックス 3）	4.0 µl
合計	20.0 µl

PCR 反応条件は遺伝子増幅装置にセットし、下記条件で行って下さい。反応終了後は 4℃で保存して下さい。

94℃: 15 秒
60℃: 60 秒　] 30 回繰返し

③3%アガロースゲル電気泳動

1） 1×TBE 緩衝液を用いて、3%アガロースゲルを作製して下さい。
2） PCR 反応後のチューブに 4 µl の試薬 G （6×ローディングバッファー)を加え、良く混合して下さい。
3） この混合液をアガロースゲルのウェルに 6 µl アプライして下さい。
4） 電気泳動条件は、100 V、35 分間程度(ミニゲル電気泳動装置の場合)を目安にして下さい。分子量マーカーは 100 bp DNA Ladder が好適です。

④アガロースゲルの染色

電気泳動後のゲルを 0.5 µg/ml の臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し、ゲルを染色して下さい。染色後のゲルを蒸留水の入ったバットに移して脱色し、UV トランスイルミネーター下でゲルを写真撮影して下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090
〒541-0048 大阪市中央区瓦町2丁目5番1号 (06)6231-1672
〒812-0007 福岡市博多区東比恵2丁目22番3号 (092)414-9361
http://www.kanto.co.jp/
e-mail: reag-info@gms.kanto.co.jp

取 扱 説 明 書 シカジーニアス® 病原遺伝子検出PCRキット（下痢原性大腸菌用）
Cica Geneus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic *E.Coli*)

8. バンドパターンの変換

バンドパターンの読み取りは、濃淡に関わらずポジティブコントロールを基準とし、目的サイズのバンドがある場合（1）、無い場合（0）として下さい。16S rDNA を除いた 7 個の増幅産物にはそれぞれ係数が割り振られています（表 1）。

表 1　検出される遺伝子の種類とその増幅産物サイズ

	遺伝子名	bp	係数
Reaction mixture 1	*eaeA*	384	1
	stx1	132	32
	stx2	93	64
Reaction mixture 2	*est*	130	16
	elt	62	8
Reaction mixture 3	*aggR*	575	2
	invE	382	4
	16S rDNA	120	インターナルコントロール

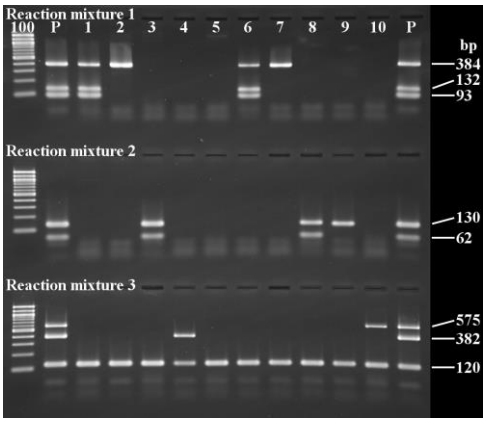

図 1　電気泳動例

下記の 10 株について本キットを用いて解析した電気泳動パターンの実例。
100：100 bp ラダーマーカー、P：ポジティブコントロール（試薬 F）、1：ATCC® 35150（EHEC）、2：ATCC® 43887（EPEC）、3：ATCC® 35401（ETEC）、4：ATCC® 43893（EIEC）、5：ATCC® 25922（非病原性大腸菌）、6～10：臨床分離株

泳動条件は、3%アガロース KANTO HC（1×TBE 緩衝液）で、Mupid-exU を用いて 100 V で 35 分間としました。13 穴のコームを使い、サンプルを 8 µl アプライし、泳動しました。
＊上記のアガロースゲルは、一枚に 13 穴コームを 3 つ刺して作成しております。

9. 病原型の判定

表 2 を参考に、係数と結果（1 または 0）を乗算したものをポイントとし、ポイントの合計を算出して下さい（表 3）。 合計ポイントを表 4 と照らし合わせ、大腸菌の病原型を判定して下さい。16S rDNA（インターナルコントロール）が検出されない場合、検体が大腸菌以外の微生物であるか、あるいは PCR が正しく行われていない可能性が考えられます。

表 2　係数への変換方法例（図 1 のサンプル番号 1（ATCC® 35150））

	遺伝子名	bp	係数		結果		ポイント
Reaction mixture 1	*eaeA*	384	1	×	1	＝	1
	stx1	132	32	×	1	＝	32
	stx2	93	64	×	1	＝	64
Reaction mixture 2	*est*	130	16	×	0	＝	0
	elt	62	8	×	0	＝	0
Reaction mixture 3	*aggR*	575	2	×	0	＝	0
	invE	382	4	×	0	＝	0
	16S rDNA	120	−		1		
合計ポイント						＝	97

上記の 97 の場合は、EHEC/STEC（*stx1*+、*stx2*+）と判定出来ます。

表 3　バンドパターンの読み取り（図 1 の電気泳動結果の場合）

	遺伝子名	bp	係数	図 1 におけるサンプル番号									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaction mixture 1	*eaeA*	384	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	stx1	132	32	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	stx2	93	64	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Reaction mixture 2	*est*	130	16	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
	elt	62	8	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Reaction mixture 3	*aggR*	575	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	invE	382	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	16S rDNA	120	−	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
合計ポイント				97	1	24	4	0	97	1	24	16	2
病原型の判定				EHEC/STEC	EPEC	ETEC	EIEC	その他	EHEC/STEC	EPEC	ETEC	ETEC	EAEC

表 4　合計ポイントと下痢原性大腸菌の病原型

合計ポイント	病原型
0	EHEC/STEC、EPEC、ETEC、EIEC、EAEC 以外の大腸菌または近縁の微生物
1	EPEC
2	EAEC
4～7	EIEC ※赤痢菌の可能性あり 10.使用上の注意事項を参照
8～11	ETEC（*elt*＋）
16～19	ETEC（*est*＋）
24～27	ETEC（*est*＋、*elt*＋）
32～35	EHEC/STEC（*stx1*＋）
64～67	EHEC/STEC（*stx2*＋）
96～99	EHEC/STEC（*stx1*＋、*stx2*＋）
上記以外	混合感染が疑われる

10. 使用上の注意事項

1）テンプレート DNA は 10～100 ng/µl 程度に調製して下さい。
2）菌種によっては、非特異的な DNA 断片が認められる場合があります。表 1 に記載したサイズの DNA のみを判定基準として下さい。
3）*stx2*（志賀毒素 2 型産生遺伝子）は、バリアントによっては検出できない場合があります。 例）*stx2f*
4）*invE* 遺伝子はプラスミド上にある侵入性遺伝子のため、脱落する場合があります。生化学的性状や細胞培養試験などを併用して判断して下さい。
5）本キットでは EIEC と赤痢菌を区別することはできません。また、合計ポイントが 36 の場合、志賀赤痢菌の可能性が疑われます。
6）各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、-20℃以下で小分け保存して下さい。
7）使用される遺伝子増幅装置によって、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR 条件の最適化が必要な場合がございます。
8）本キットは研究用として販売しております。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。

11. 関連製品

製品番号	製品名	容量	用途
08203-96	シカジーニアス® DNA プレップキット（糞便用）	100 回	DNA 精製用
01016-96	AptaTaq DNA Master	500 µl	分子生物学用
24080-96	6 倍濃縮ローディングバッファー	2ml×6	電気泳動用
24079-96	6 倍濃縮ローディングバッファー オレンジ G	2ml×6	電気泳動用
72089	クロモアガーSTEC	1L 用	EHEC 鑑別用
72090	クロモアガーSTEC 生培地	10 枚	EHEC 鑑別用
71755	エンテロヘモリジン血液寒天培地	5 枚	EHEC 鑑別用

12. 参考文献

1）公立大学法人大阪市立大学、株式会社 KALS、株式会社三共刃型工業；「下痢原性大腸菌検出方法」、特許公開 2008-283895
2）Rüttler, M. E. et al, *Biocell* **30** (2): 301 − 308, 2006.
3）Hiroe, A. et al, *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (9): 3177 − 3184, 2012.

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090
〒541-0048 大阪市中央区瓦町2丁目5番1号 (06)6231-1672
〒812-0007 福岡市博多区東比恵2丁目22番3号 (092)414-9361
http://www.kanto.co.jp/
e-mail: reag-info@gms.kanto.co.jp